



12

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 44 03 967 C 2

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 1/04
C 07 H 21/00

②① Aktenzeichen: P 44 03 967.0-43
②② Anmeldetag: 4. 2. 1994
④③ Offenlegungstag: 18. 8. 1994
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 18. 4. 2002

DE 44 03 967 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑥⑥ Innere Priorität:
P 43 03 843. 3 10. 02. 1993

⑦③ Patentinhaber:
Biosynton Gesellschaft für bioorganische Synthese
mbH, 13125 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125
Berlin

⑦② Erfinder:
Haenel, Jürgen, Dr., 10407 Berlin, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
US 47 59 635
US 44 98 785
US 44 65 377

⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Peptiden, Peptoiden und Oligonukleotiden und deren
Verwendung

⑤⑦ Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Peptoiden und
Oligonukleotiden durch vollautomatische, simultane und
multiple Festphasensynthese, dadurch gekennzeichnet,
daß man
die individuellen Träger-Reagenzien-Mischungen oder
Träger-Wasch-Mischungen in allen Reaktionsgefäßen
durch einen in der Schwebe gehaltenen Magnetrührer
rührt,
die Verteilung der Reagenzien oder Waschflüssigkeiten
mittels eines Pipettier-Roboters durchführt und
gegebenenfalls die Reaktionsgefäße temperiert und/oder
vibrieren läßt.

DE 44 03 967 C 2

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Peptoiden und Oligonukleotiden und deren Verwendung durch vollautomatische, simultane und multiple Festphasensynthese und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens und deren Verwendung gemäß den Patentansprüchen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die chemische und die pharmazeutische Industrie und die Laborgeräteherstellung.

[0002] Der Stand der Technik soll nachfolgend an Hand der simultanen, multiplen Festphasen-Peptidsynthese dargestellt werden.

[0003] Zur vollautomatischen Festphasenpeptidsynthese werden seit ca. 30 Jahren das von Merrifield entwickelte Verfahren (z. B. R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 (1963) 2149; G. Barany, R. B. Merrifield in The Peptides, Analysis, Synthetics, Biology, Vol. 2, 1-284 (1980), Hrsg. Gross, Meierhofer Academy Press, New York) und weiter entwickelte Ausführungen (z. B. DE 36 31 662, DE 38 28 576, DE 40 05 518, DE 40 06 349) angewendet. Dabei wird zur Durchmischung der Reagenzien und zur Beschleunigung der Austauschreaktion zwischen fester Phase/Träger z. B. Harz und Reagenzienmischung üblicherweise das Reaktionsgefäß geschüttelt oder die Reagenzienmischung umgepumpt. Für alle Durchmischungsprozesse muß hierbei in der Regel die ungenügende mechanische Stabilität der Harze berücksichtigt werden. "Deshalb fanden hierfür Magnetrührer kaum Anwendung. Auch die bereits bekannten schwimmenden Rührer, die entweder freischwimmend sind (US 44 98 785), von oben geführt werden (US 47 59 635) oder durch einen Führungsstab mit dem Deckel verbunden sind (US 44 65 377) dürften kaum von Vorteil bzw. für die Aufgabenstellung ungeeignet sein". Beim Übergang zur simultanen, multiplen Festphasen-Synthese treten in diesem Zusammenhang Probleme auf, die bisher nur ungenügend gelöst worden sind.

[0004] Die bisher auf dem Markt erhältlichen Geräte der Firma Zinsser Analytik bzw. Abimed zur simultanen, multiplen Peptidsynthese beschreiten hierbei verschiedene Wege, um diese Probleme zu überwinden (DE 40 06 349 A1, DE 38 28 578 A1). Zum einen wird, nachdem sich das Harz abgesetzt hat, aus dem Überstand der Reagenzienmischung über dem Harz ein bestimmtes Volumen über eine Kanüle abgesaugt und gleich darauf zurückgespritzt. Dies erfordert ein zusätzliches Volumen zur Bildung des Überschusses und damit verbunden einen unnötig grossen Reagenzienüberschuß. Eine ausreichende Durchmischung wird nur bei sehr geringen Harzmengen erreicht. Schon mit 20 mg Harz kann es hierbei zu Problemen bei der Durchmischung der Reagenzien kommen, und mit noch größeren Harzmengen sinkt die Effizienz dieser Durchmischungsmethode sehr schnell ab. Auf dem anderen Wege wird versucht, Lösungsmittel unterschiedlicher Dichte derart zu mischen, daß das Harz in der Mischung frei schwimmt. Nachteilig ist hier die Verringerung der aktiven Reagenzkonzentrationen durch das zweite Lösungsmittel. Das notwendige Volumen an dem zweiten Lösungsmittel, das für das freie Schwimmen des Harzes benötigt wird, ist überdies abhängig vom Harz und auch von der Peptidsequenz, ändert sich demzufolge auch während der Synthese. Folglich ist das freie Schwimmen des Harzes schwerlich in allen Fällen zu gewährleisten. Die Effizienz der Durchmischung ist auch hierbei gering und sinkt ebenfalls mit zunehmender Harzmenge.

[0005] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur simultanen, multiplen Festphasen-Synthese bereitzustellen, womit die oben genannten Nachteile vermieden werden. Diese Nachteile treffen analog

auch für die Festphasensynthesen anderer bioorganischer Polymerer zu.

[0006] Die Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen 1 bis 8 dargelegten Maßnahmen gelöst. Die Durchmischung der Reagenzien mit dem Träger erfolgt erfindungsgemäß durch einen in der Schwebe gehaltenen Magnetrührer in den einzelnen Reaktionsgefäßen, was insbesondere bei ungenügender mechanischer Stabilität der Harze von entscheidendem Vorteil ist. Damit wird ein eventueller Abrieb der Harze, der zur Verstopfung von Fritten oder Pipetten führen kann, vermieden.

[0007] Die Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt durch eine Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 5 bis 7. Hierfür wird in einem kreisförmig angeordnetem Spulensystem unter jedem Reaktionsgefäß bzw. um jedes Reaktionsgefäß herum ein Drehfeld erzeugt. Der die Wicklungen durchfließende Strom baut ein rotierendes Magnetfeld auf, welches an einem in diesem System befindliche Magnetrührer ein Drehmoment erzeugt, wobei sich die Drehzahl des Rührers regeln läßt. Wird das in der Regel zylindrische Reaktionsgefäß in das Innere des Spulensystems gebracht, dann wird der Magnetrührer in das rotierende Magnetfeld hineingezogen, falls er sich unter dem Niveau des Magnetfelds befand, und kann sich nun freier in der Suspension bewegen. Nach dem Abschalten des Magnetfeldes sinken Rührer und Harz zu Boden und die überstehenden Lösungen können entweder von oben abpipettiert oder vorteilhafter durch eine Fritte im Boden der Reaktionsgefäße hindurch abgesaugt oder auch durch ein Schutzgas, z. B. Stickstoff, durch die Fritte hindurch abgedrückt werden.

[0008] In der einfachen Variante kann die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens auch als effiziente und schonende Wasch- und Filtriereinheit, vorzugsweise für Biopolymere, trägergebundene Biopolymere, Zellsuspensionen und andere empfindliche biologische Materialien verwendet werden.

[0009] Durch die Erfindung wird eine effektive Harz-Reagenzien-Durchmischung erreicht und dadurch die Zuverlässigkeit der individuellen Synthesen und einzelnen Syntheseschritte erhöht. Dies führt zu einem reineren Rohprodukt bei gleichzeitig verringertem Einsatz von Reagenzien. So wird beispielsweise bei der Synthese des 18-mer Peptids Monochloracetyl-GKKRKPGGGWNTGGFRY-OH, verglichen mit einer analogen Synthese ohne Magnetrührer, eine Ausbeutesteigerung von 50% auf 80% (Zielsequenz des Rohprodukts) erreicht.

[0010] Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden, durch das die Erfindung aber nicht eingeschränkt wird.

Ausführungsbeispiel

[0011] Eine Stahlplatte mit den Abmessungen Breite 195 × Länge 360 × Höhe 35 mm verfügt über 5 × 10 = 50 durchgehende Bohrungen. Die Bohrungen weisen einen Durchmesser von 18 mm auf und befinden sich im Abstand von 30 mm zueinander. Die Spulen zur Erzeugung des Drehfeldes sind kreisförmig um jedes Bohrloch unterhalb der Stahlplatte angeordnet.

[0012] Die Haltevorrichtung für die Reaktionsgefäße mit einem Außendurchmesser von 16 mm befindet sich oberhalb der Stahlplatte. Die Reaktionsgefäße werden so angeordnet, daß sich ihr Boden in Höhe der Oberkante der Stahlplatte, im Innern der planaren Einheit oder ca. 5 mm unterhalb der planaren Einheit befindet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Peptoiden und Oligonukleotiden durch vollautomatische, simultane und multiple Festphasensynthese, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
die individuellen Träger-Reagenzien-Mischungen oder Träger-Wasch-Mischungen in allen Reaktionsgefäßen durch einen in der Schwebe gehaltenen Magnetrührer rührt,
die Verteilung der Reagenzien oder Waschflüssigkeiten mittels eines Pipettier-Roboters durchführt und gegebenenfalls die Reaktionsgefäße temperiert und/oder vibrieren läßt.
2. Verfahren nach Ansprüchen 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reagenzien oder Waschflüssigkeiten gleichzeitig aus allen Reaktionsgefäßen durch eine im Boden befindliche Filterfritte entfernt, vorzugsweise durch Anlegen eines Vakuums oder durch ein mit einem Schutzgas erzeugten Überdruck.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktionsgefäße auf 0 bis 120°C, vorzugsweise auf 30 bis 50°C temperiert.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Vibration der Reaktionsgefäße durch Ultraschall veranlaßt.
5. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Ansprüchen 1 bis 4, gekennzeichnet durch in einer planaren Einheit zusammengefaßte, zur Erzeugung rotierender Magnetfelder kreisförmig angeordnete Spulensysteme, die sich oberhalb oder unterhalb der in einer Haltevorrichtung fixierten Reaktionsgefäße befindet, durch senkrechte Bohrungen in der planaren Einheit im jeweiligen Mittelpunkt der Spulensysteme und durch eine Positionierung des Bodens der zylindrischen Reaktionsgefäße oberhalb, innerhalb oder unterhalb der planaren Einheit.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch in der planaren Einheit angeordnete Temperiervorrichtungen.
7. Vorrichtung nach Ansprüchen 5 und 6, gekennzeichnet durch, angeordnete Heizspulen, Flächenheizungen, Heizfolien oder Thermostaten.
8. Verwendung der Vorrichtung nach Ansprüchen 5 und 6 als Wasch- und Filtriereinheit für Biopolymere, trägergebundene Biopolymere und Zellsuspensionen.

- Leerseite -